

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AE

(11)Publication number : 2002-097152
(43)Date of publication of application : 02.04.2002

(51)Int.CI. A61K 35/84
A61P 35/00
A61P 43/00

(21)Application number : 2000-288295 (71)Applicant : RIKOMU:KK
(22)Date of filing : 22.09.2000 (72)Inventor : ISHITANI KUNIHIKO

(54) ANTITUMOR COMPOSITION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new antitumor composition, a composition for NK cell activity enhancement, a composition for ammonia concentration reduction in blood and a cancer immune response induction composition.

SOLUTION: This antitumor composition, this composition for NK cell activity enhancement, this composition for blood ammonia concentration reduction and this cancer immune response induction composition comprises a mushroom essence as an active ingredient.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-97152

(P2002-97152A)

(43)公開日 平成14年4月2日 (2002.4.2)

(51)Int.Cl.⁷
A 61 K 35/84
A 61 P 35/00
43/00

識別記号
107

F I
A 61 K 35/84
A 61 P 35/00
43/00

デマコード (参考)
A 4 C 0 8 8
107

審査請求 未請求 請求項の数7 O.L. (全6頁)

(21)出願番号 特願2000-288295(P2000-288295)

(22)出願日 平成12年9月22日 (2000.9.22)

(71)出願人 591163546
株式会社リコム
東京都豊島区南池袋1-19-12 山の手ビル東館12階
(72)発明者 石谷 邦彦
北海道札幌市白石区東札幌3条3丁目7番
35号
(74)代理人 100059959
弁理士 中村 稔 (外9名)
Fターム(参考) 4C088 AA02 AC17 BA08 ZB22 ZB26

(54)【発明の名称】 抗腫瘍組成物

(57)【要約】

【課題】新規な抗腫瘍組成物、NK細胞活性増強用組成物、血中アンモニア濃度低下用組成物、癌免疫応答誘導組成物を提供すること。

【解決手段】マッシュルームエキスを有効成分とする抗腫瘍組成物、NK細胞活性増強用組成物、血中アンモニア濃度低下用組成物、癌免疫応答誘導組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マッシュルームエキスを有効成分とする抗腫瘍組成物。

【請求項2】 マッシュルームエキスを有効成分とするNK細胞活性増強用組成物。

【請求項3】 マッシュルームエキスを有効成分とする血中アンモニア濃度低下用組成物。

【請求項4】 マッシュルームエキスを有効成分とする癌免疫応答誘導組成物。

【請求項5】 マッシュルームが、アガリカス・ビスピラスである請求項1～4のいずれか1項記載の組成物。

【請求項6】 マッシュルームエキスが、マッシュルーム抽出液を濃縮またはフリーズドライまたは熱風乾燥したものである請求項1～5のいずれか1項記載の組成物。

【請求項7】 経口投与形態にある請求項1～6のいずれか1項記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、抗腫瘍組成物、NK細胞活性増強用組成物、血中アンモニア濃度低下用組成物及び癌免疫応答誘導組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 ナチュラルキラー細胞（以下、NK細胞という）は、極めて多様な機能を有していることが知られている。即ち、(1)腫瘍細胞の発生・増殖・転移抑制、(2)感染症の抑制、(3)免疫機能の増強及び制御、(4)疾患への関与、などである。最近では(5)慢性疲労症候群にも関与しているといわれている。通常、ヒトの細胞分裂において、正常細胞の他に、まれに腫瘍細胞が発生するといわれているが、発生した腫瘍細胞を殺傷するのはNK細胞だといわれている。これはNK細胞が非特異的に各種腫瘍細胞を攻撃し、LAK細胞への変化によって腫瘍に対する免疫学的監視機能を持っているためである。

【0003】 NK細胞は、インターフェロン、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、GM-CSFあるいはTNFを産生することにより、キラー活性が増強されることが知られている。これによりウイルスや寄生虫、真菌、一般の細菌などに対し、これらを殺傷する能力が増強される。NK細胞はまた、各種サイトカインを産生し、造血幹細胞の増殖・分化を抑制する事により免疫機能の制御も行っている。G-CSF、M-CSF、GM-CSFなどのサイトカインの産生は、キラー活性を増強し、移植臓器の拒絶反応、自己免疫疾患、糖尿病、消化器疾患など各種疾患に関与していることが知られている。NK細胞はこのように多様な機能を有する生体にとって重要な細胞である。

【0004】 従来、外科手術、化学療法及び放射線療法が悪性腫瘍の三大療法となっているが、未だ充分な成果

が上がっていないのが現状である。殊に、長期間繁用される化学療法剤にあっては、総じて副作用が極めて強いのみならず、抗腫瘍効果が不定で、大腸癌、食道癌等の固形癌や、転移能の高い腫瘍には、有効な薬物はほとんど存在しない。さらに最近、エイズなどの患者や慢性疲労症候群では、NK細胞活性が低下していることがわかつてきた。これはNK細胞活性の増強により、エイズや慢性疲労症候群発症の予防や治療が可能であることを示唆している。

【0005】 このため、抗腫瘍効果を高めることを期待して様々な多剤併用療法が試みられているが、副作用の重複や増強、新たな障害や薬害等をもたらし、著しい生活の質（QOL）の低下、治療による体力の消耗や寿命の短縮等も少なからず発生している。結核菌もしくは溶連菌の菌体懸濁液等を注射することにより、NK細胞活性がわずかに上昇することが知られているが、痛みや、恶心などの副作用が強く、患者ごとに細かい対応が必要なこともあります、有効に使い切れていないのが現状である。

【0006】 悪性腫瘍に対する新しい療法として種々の免疫療法が提案されているが、研究段階であり、副作用の少ない有効な免疫療法剤の早期実現が待たれている。たとえば、NK細胞活性を増強することにより、癌細胞のアポトーシス（プログラムされた細胞死）を誘導し、癌組織を萎縮もしくは縮退できることが知られている。これまでに、数多くの多糖類がNK細胞を誘導することが知られている。しかしながら、NK細胞の活性は、血中アンモニア濃度に依存している事が予想されているので、元来これらのアンモニア濃度が高い多くの患者には、効果があまり期待できなかった。投与経路についても血管や腫瘍局所等への注射が主体であり、有用性の高い経口用の抗悪性腫瘍剤は皆無に等しいのが現状である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、上記問題点のない新規な抗腫瘍組成物を提供することである。本発明の他の目的は、NK細胞活性増強用組成物を提供することである。本発明の更に他の目的は、血中アンモニア濃度低下用組成物を提供することである。本発明の更に他の目的は、癌免疫応答誘導組成物を提供することである。本発明の別の目的は、非侵襲的な手段である経口投与により、副作用なしに悪性腫瘍を効果的に抑制又は予防することができる組成物を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者はマッシュルームエキスが血中アンモニア濃度を効果的に低下させること、NK細胞活性と血中アンモニア濃度が密接な相関を有することを見出し、本発明を完成するに至った。本発明は、マッシュルームエキスを有効成分とする抗腫瘍組成物である。

成物を提供するものである。本発明はまた、マッシュルームエキスを有効成分とするNK細胞活性増強用組成物を提供するものである。本発明はさらに、マッシュルームエキスを有効成分とする血中アンモニア濃度低下用組成物を提供するものである。本発明はさらに、マッシュルームエキスを有効成分とする癌免疫応答誘導組成物を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】NK細胞は、抗体の介在なしに直接癌細胞やウイルスに感染した細胞を攻撃することが知られている。マッシュルームエキスは、血中アンモニア濃度を下げることにより、NK細胞を増殖させ、NK細胞活性増強を主たる作用機序として、患者に重篤な副作用を伴うことなく、このNK細胞の腫瘍細胞へのアポトーシスによって腫瘍増殖抑制効果を発現するものと考えられる。本発明の抗腫瘍組成物は、このような全く新しい作用機序をもつ新規な抗悪性腫瘍剤である。本発明は、従来、確実な治療法がなく、看過されてきた極めて悪性の腫瘍に対して、新しい治療法を提供するものであり、既存の抗癌療法との併用等によって治癒率の一層の向上に資するものである。

【0010】一般的にNK細胞は、血中アンモニアの濃度が高いとその活性が弱くなることが知られていたが、具体的に血中アンモニア濃度を下げる方法はこれまでに知られていなかった。一方、マッシュルームエキスを経口投与することにより、アンモニアを主体とする便臭が激減することが知られていたが、血中アンモニア濃度が減少するかどうかについては知られていなかった。本発明者は、マッシュルームエキスを経口投与すると、便臭が激減するだけでなく、血中アンモニア濃度も大幅に減少すること、またこの血中アンモニア濃度の減少に伴い、NK細胞活性が顕著に増大することを見出した。これは全く新しいメカニズムによるNK細胞の増強法である。本発明のマッシュルームエキスを有効成分とする抗腫瘍剤は、長期連続投与が可能であり、他の薬剤との併用も可能である。このため、外科療法や放射線治療などが適用できない悪性腫瘍や、その効果が認められない悪性腫瘍への新しい治療法を提供するものである。特に、血中アンモニア濃度が増大し、NK細胞活性が低下して癌が発生しやすい条件が整っている中高年齢者においては、癌発生の予防効果が期待できるものである。

【0011】マッシュルームエキスの原料となるマッシュルームとしては、アガリカス・ビスピラスが好ましい。なお広く食用に供されている子実体を有する菌類であれば、特に制限されない。このような菌類の例としては、椎茸、ヒラタケ、シメジ等が挙げられる。この明細書においてマッシュルームエキスとは、このような菌類の抽出物も含むものとする。

【0012】マッシュルームエキスの抽出溶媒としては、水、アルコール類(例えば、エチルアルコール、グ

リセリン、プロピレングリコール等)、有機酸(例えば、乳酸、酢酸等)、無機塩類(例えば、イーストフード等)を含む水溶液、或いはこれらの2種以上の混合物が挙げられる。

【0013】マッシュルームエキスを抽出する溶媒のpHは酸性(好ましくはpH 1~6、より好ましくはpH 3.0~5.0)が好ましい。酸としては、塩酸、硫酸、リン酸、などの鉱酸や、酢酸、乳酸、酪酸、パルミチン酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、アスコルビン酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、カンファースルホン酸等の有機酸が用いられる。これらのうち好ましいものは有機酸であり、さらに好ましくはリンゴ酸及びクエン酸である。これらの酸の添加量は、必要なpHとするのに適切な量であるが、例えば、抽出溶媒中、0.05~2.0質量%である。しかしながら、抽出は中性pHでも可能である。その場合は、適当な塩類、例えば、上記の有機酸や無機酸のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、具体的には、リンゴ酸ナトリウム、クエン酸カリウム、食塩、塩化カルシウム等や、界面活性剤、親水性溶媒、例えば、エチルアルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、エトキシ化イソステアリアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等の追加成分を加えて、中性で抽出することもできる。これらの塩、その他の添加剤の添加量はそれぞれ、好ましくは0.05~2.0質量%である。抽出は、細かく破碎あるいはスライスした新鮮なマッシュルーム子実体1質量部に抽出溶媒2~10質量部を加え、好ましくは40℃~120℃、さらに好ましくは80℃で2時間以上、90℃で30分以上行えばよい。マッシュルームエキスの製造方法については、特許第2930323号、米国特許第5639470号、欧州特許第381055号に詳細に記載されている。

【0014】本発明のマッシュルームエキスを有効成分とする組成物は、経口的に、ヒトを含む、ほ乳動物に投与することができる。例えば、本発明の組成物は、ゼリー、みそ汁、スープ、ポタージュ、飴、煎餅、ビスケット、パン等の食品等と混合して経口投与することもできる。

【0015】本発明の組成物の投与単位形態は、上記食品としての形態の他、治療目的に応じて適宜選択できる。具体的には、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤等が例示できる。ここで用いられる製剤担体としては、通常の薬剤に汎用される各種のもの、例えば充填剤、增量剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤ないし賦形剤等を例示できる。

【0016】錠剤の形態に成形するに際しては、担体として例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水、エタノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキ

シメチルセルロース、セラツク、メチルセルロース、リソ酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩等の滑沢剤等を使用できる。更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被包錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠等とすることができる。

【0017】丸剤の形態に成形するに際しては、担体として例えば、ブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン等の結合剤、ラミナラン、カンテン等の崩壊剤等を使用できる。カプセル剤は本発明の有効成分であるマッシュルームエキスを上記で例示した各種の担体と混合し、硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセル等に充填して調製される。

【0018】更に上記各組成物には必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を配合してもよい。

【0019】本発明の組成物中に含まれるマッシュルームエキスの量は特に限定されず、適宜選択すればよいが、組成物中、乾燥質量換算で、好ましくは1～80質量%、さらに好ましくは5～50質量%程度とするのがよい。

【0020】本発明の組成物は経口投与するのが好ましい。投与方法は、各種組成物の製剤形態、患者の年齢、性別、患者の症状の程度、その他の条件に応じて決定される。例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤は経口投与される。

【0021】本発明の組成物の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件により適宜選択できる。通常、マッシュルーム抽出物(乾燥質量換算)を0.01～500mg/kg/日程度、好ましくは5～100mg/kg/日程度、さらに好ましくは1～80mg/kg/日程度の範囲となる量を目安とするのがよい。これら本発明の組成物は1日に1回又は2～4回程度に分けて投与することができる。

【0022】本発明の抗腫瘍組成物、とりわけ抗悪性腫瘍剤を投与することにより治療できる悪性腫瘍としては、特に制限はなく、例えば、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆のう・胆管癌、肺腺癌、結腸癌、直腸癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、睾丸腫瘍、骨・軟部肉腫、皮膚癌、悪性リンパ腫、急性白

血病、エイズ、脳腫瘍等が挙げられる。さらにその作用メカニズムがNK細胞を介していることが示唆されるので、これまで対応する治療法、治療薬がなかった慢性疲労症候群にも有効であると考えられる。

【0023】

【実施例】以下に参考例、実施例、試験例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明する。これらは例示、説明のためのものであって何ら本発明を限定するものではない。

参考例1

10 新鮮なマッシュルーム(アガリカス・ビスピラス)の子実体1kgに、0.5質量%クエン酸水溶液3kgを加えてpH5.0以下とし、80°Cで2時間抽出し、抽出物を約半分になるまで減圧濃縮し、フィルターで濾過して抽出液2.5kgを得た。これを凍結乾燥して40gのマッシュルームエキスを得た。

【0024】参考例2

新鮮なマッシュルーム(アガリカス・ビスピラス)の子実体10kgに、1質量%リンゴ酸水溶液20kgを加えてpH5.0以下とし、70°Cで70分間抽出した。抽出液20kgを10倍濃縮して2kgの濃縮液を得た。この濃縮液2kgに、デキストリン1.64kgを加え、スプレードライ加工し、粉末1kgを得た。これらの濃縮物、及び粉末は、株式会社リコムから「シャンピニオンエキス」(登録商標)という商品名で市販されている。

【0025】実施例1

参考例1で調製したマッシュルームエキス1質量部をゼリー500質量部に添加混合して、マッシュルームエキスを含むゼリーを調製した。このゼリーはNK細胞活性増強用として使用できる。

【0026】実施例2

参考例2の粉末1g、乳清カルシウム0.2g、イソマルトオリゴ糖0.2g、セルロース0.1gを混合し、顆粒分包に配合した。この配合物は血中アンモニア濃度低下用組成物として使用できる。

実施例3

参考例2の粉末1gに粉末スープ又は粉末みそ汁又は固形ブイヨンエキス又は粉末ポタージュをそれぞれ1～5g加え、癌免疫応答誘導組成物を調製した。

【0027】試験例1

40 以下の試験に同意する老人保健施設の高齢者13人を対象として、実施例1で調製した、マッシュルームエキス0.2gを含有するゼリー100gを1日2本、朝及び夕に、一ヶ月間継続して摂食してもらった(マッシュルームエキス(固形分0.2質量%)として0.4g/日)。投与前と投与後の血中アンモニア濃度とNK細胞活性、その他の血液中各種細胞数の増減を比較した。

【0028】1) 血液検査：下記の検査のため、試食開始前と試食1カ月後、各々12ml採血し、該当する保存容器に分注し、試験に供した。

50 【0029】2) NK細胞活性：血液6mlを採血管

(保存液へパリン含有)に分注し、室温にて保存した。K562細胞に取り込ませた放射性クロミウム-51の放出をメルクマールとする方法により血中のNK細胞活性を測定した。すなわちマッシュルームエキス投与前の患者から10~15mlの血液を採取し、PBS(リン酸緩衝液を含む生理食塩水)で2倍に希釈、比重1.007のフィコールーコンレイ密度勾配液に重層、室温で30分間1350r.p.m.で遠心分離した。単核球細胞を集め、これを末梢血単核細胞(PBMC)とした。GIBCのRPMI 1640培地で3回洗浄した後、PBMCを10%子牛血清(FCS)を含むRPMI 1640培地に懸濁し、細胞濃度を $5 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように調整した。細胞の生存率はトライパンブルーでチェックし、常に95%以上を確保した。PBMCはマッシュルームエキス投与後にもを集められ、同様の処理が加えられた。

【0030】白血病細胞のK562細胞株が標的細胞として用いられた。この株は10%FCSを含むRPMI 1640で培養され、5%CO₂を含む空気中37℃の条件下、放射性クロム酸ナトリウム(Na₂⁵¹CrO₄、10⁶細胞当たり3.7MBq)で1時間ラベルした。標識後、細胞をRPMI 1640で3回洗い、10%FCSを含むRPMI 1640で $10^5 / \text{ml}$ になるよう調整した。NK細胞活性は標準の4時間クロミウム放出分析法で測定した。それぞれ100μlのPBMCとK562細胞を50:1の割合で96穴のマイクロプレートのなかで混合した。最大放出量はK562細胞に界面活性剤を混合することにより決定された。自発的な放出量はPBMCなしの培養K562細胞の放出量を基準にした。5%CO₂を含む空気中、37℃4時間の保温の後で、上清を集め放射活性をガンマカウンターで測定した。

【0031】すべての分析はn=3で行い、値はその平均値として計算された。細胞傷害性の割合は、(測定値-自発活性値) / (最大値-自発活性値) × 100として計算された。すべての実験において、自発活性値は最大放出値の10%以下であった。サンプル量に限りがあるため、測定は、PBMCとK562細胞が50:1の割合のみで行われた。

【0032】3) アンモニア濃度測定用に血液1mlを

採血管(除蛋白液4ml含有)へ分注した。アンモニアはネスラー試薬などを用いて分析することができるが、より正確なデータを得るために、我々は奥田・藤井(血中アンモニア直接比色定量法)最新医学:第21巻第3号622-627頁、1966)の改良変法を用いた。

【0033】マッシュルームエキス投与前後のアンモニア濃度(単位はppm)を図1に、NK細胞活性(単位は、血液1μl中の個数)を、図2に示す。図1及び2から、血中アンモニア濃度の減少とNK細胞活性の増加の間に10は、強い相関があることがわかる。すなわち、患者SAと患者MHにおいては、血中アンモニア濃度が増加し、NK細胞活性が減少しているのに対して、他の11人の患者では、血中アンモニア濃度が減少し、NK細胞活性が増加している。患者SAと患者MHにおいて、血中アンモニア濃度が増加した理由は不明であるが、アンモニア濃度の減少とNK細胞活性の増加が強い相関を有することは明らかである。

【0034】

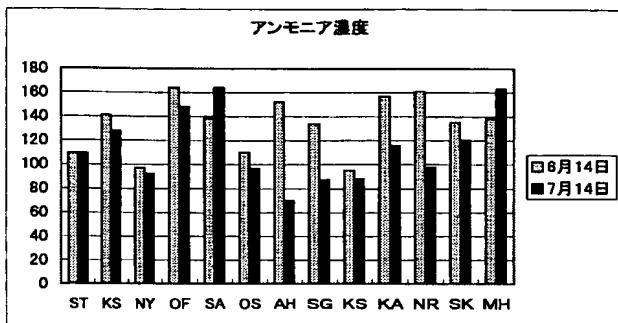
【発明の効果】本発明の組成物は、マッシュルームエキスを有効成分とするものであり、経口投与が可能であり、患者に負担がなくかつ副作用が全くない、若しくは極めて少ない。本発明の組成物は、血中アンモニア濃度を減少させてNK細胞の活性を増強することにより、NK細胞がターゲットとする、たとえば、悪性腫瘍やエイズなどの免疫性疾患、肝炎などのウイルス感染症、慢性疲労症候群などの治療分野における、画期的な治療組成物として有用である。とりわけ、初期癌から末期癌にまで有効であり、長期連続投与が可能で、副作用もないことからQOLの高い治療手段を提供するものである。その性状から、他の薬剤、治療法との併用も多くの場合可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】マッシュルームエキス入りゼリー投与前と後での血中アンモニア濃度の比較を示す図面である。

【図2】マッシュルームエキス入りゼリー投与前と後でのNK細胞活性の比較を示す図面である。グラフ縦軸の単位は、NK細胞活性の増加率を示す。

【図1】



【図2】

